Lane Medical Library

Über diphtheriebazillenähnliche Keime des menschlichen Rachens.

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität

zu Gießen

vorgelegt von

FERDINAND STENGER

aus Seligenstadt/Hessen

1936

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Gießen.

Referent: Prof. Dr. Kliewe.

Schon der Entdecker des Diphtheriebazillus, Löffler, beschrieb 1884 und 1887 in Abstrichpräparaten von gesunden Menschen Stäbchen, die nicht genau die Form der Di-B. hatten. In den folgenden Jahrzehnten wurde von zahllosen andern Autoren (Roux und Jersin, Martin, Bernhard und Paneth, Kilian, Trautmann und Dale, Gins und Fortner, Almquist und Korean, Baerthlein, Kliewe, Scheepers, Kutschnarjew, Pariste, Seiffert u. a.) über die Vielgestaltigkeit und Variabilität der Di-B. und Pseudodi-B. in Kulturen und im menschlichen Körper berichtet. Man beschrieb Di-B., die nicht nur Pseudodi-B. ähnlichen Charakter hatten, sondern sich in staphylokokkenähnliche Gebilde umgewandelt hatten; andere sahen dicke, aufgeblasene Formen oder lange und gewundene, in Knäuel liegende Fäden, von denen seitlich Verzweigungen abgingen. Alle diese morphologischen Variationen sind auf geringfügige Verschiebungen in der Wasserstoffionenkonzentration, auf die Zusammensetzung und den Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens zurückzuführen oder vom Alter der Kultur, von der Intensität des Wachstums und andern uns noch unbekannten Faktoren abhängig. Der gleiche Di-Stamm kann sich auf künstlichem Nährboden soweit umformen, daß er von Pseudodi-B. nicht mehr zu unterscheiden ist; ja man kann Zweifel hegen, ob die betreffenden Keime überhaupt Corynebakterien sind. Nicht selten wird auch beobachtet, daß unter den Lebensbedingungen, die der Di-B. auf der Schleimhaut der oberen Luftwege, in Wunden usw. findet, weitgehende Veränderungen, Standorts-Modifikationen, auftreten. Diese Variationen haben manche Autoren mit einem besonderen Namen bezeichnet. Zu erwähnen sind die Fadendi-B. von Meissner, die Paradi-B. von Lubinski, die Eutercorynebakterien von Evans und Stech usw. Ob diese Abtrennung von echten Di-B. begründet ist, werden wir später besprechen. Allgemein gesagt, stehen die meisten Autoren auf dem Standpunkte, daß wohl eine weitgehende Abänderung der beiden Arten erfolgen kann, daß aber eine Umwandlung der einen Art in die andere nicht stattfindet. Wenn Radice bei experimenteller Infektion von Hautwunden bei Tieren eine Umwandlung der echten Di-B. in Paradi-B. fand, so hat Pesch bei seinen Versuchen solche Umwandlungen nicht bekommen können. Nach Kliewe ist die Frage, ob die Paradi-B., die übrigens seiner Ansicht nach als Pseudo-B. anzusehen sind, aus den echten Di-B. entstehen, noch nicht gelöst. Daß im Rachen des Rekonvaleszenten oder bei Bazillenträgern weitgehende Veränderungen der Di-B. auftreten können, ist heute jedem

Bakteriologen geläufig, und die Ansicht, daß die Di-B. und Pseudodi-B. als zwei getrennnte Arten aufzufassen sind, ist ebenso begründet wie beim Typhus- und Parathyphusbazillus. Auch hat man wissenschaftlich exakt noch niemals den Übergang der Pseudodi-B. in Di-B. beobachtet. Nach Gins stellen Di-B. und Pseudodi-B. in ätiologischer Hinsicht zwei verschiedene Arten dar. Diese Auffassung schließt nicht aus anzunehmen, daß die beiden Arten phylogenetisch zusammengehören. Die bisherigen Ergebnisse haben vielmals gezeigt, daß die Variabilität der Di-B. so groß ist, daß man von Überschneidungen der Formenkreise der Di-B. und Pseudodi-B. sprechen kann. Wie nun einerseits durch weitgehende Variation das morphologische Aussehen der Di-B. und Pseudodi-B. geändert werden kann, so kennen wir andererseits eine Reihe von Bakterien, die keine verwandtschaftlichen Beziehungen zu Corynebakterien haben und ihnen doch im nach Neisser gefärbten Präparat sehr ähnlich sehen, vor allem bilden sie auch Polkörperchen. Abgesehen von den farbstoffbildenden Corynebakterien nenne ich hier beispielsweise die Choleravibrionen, Procyaneusbazillen, die echten Di-B. täuschend ähnlich sehen können. Ferner zeigen manche säurefeste Bakterien, Leptothrixarten, volutinspeichernde, sporenbildende Bakterien (Prell), das B.- bifidum und Milchsäurebakterien usw. wegen ihrer Polkörperchenfärbung diphtheriebazillenähnliches Aussehen. Nun haben sowohl die Beziehungen zwischen den verschiedenen Formen der Di-B. und Pseudo-B. als auch dieser zu ihnen morphologisch ähnlichen Bakterienarten nicht allein wissenschaftliches Interesse, sondern sind für den Epidemiologen und für die bakteriologische Diagnostik von größter Bedeutung. Denn es ist nicht gleichgültig, ob man bei der Diagnosenstellung einen atypischen Stamm zu den Di-B. oder Pseudodi-B. zählt. In ersterem Falle wird der Träger solcher Keime als Bazillenträger angesehen, der eine Ansteckungsquelle bilden kann. In dem andern Falle ist der Befund belanglos. Aus diesen Gründen ist eine genauere Charakterisierung der gefundenen Corynebakterien angezeigt.

Bei unseren umfangreichen Di-Untersuchungen haben wir häufig Bazillen gefunden, die ebenfalls eine Ähnlichkeit mit Di-B. hatten und von weniger geübten Untersuchern als echte Di-B. angesehen werden können. In einem Falle wurde auch in einem Institut eine falsche und folgenschwere Diagnose gestellt, da die betreffende Person, da sie angeblich Bazillenträgerin sei, ihren Beruf als Kinderpflegerin aufgeben müßte. Den reingezüchteten Stamm, der uns freundlicherweise für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt wurde, haben wir mit andern aus unserem Untersuchungsmaterial reingezüchteten Stämmen untersucht. Da wir unsere Stämme vorwiegend aus dem Rachen von Kindern züchteten, nahmen wir an, es könnten sich um die in der Milch vorkommenden Eutercorynebakterien oder um im Kuhkot vorkommende diphtheriebazillenähnliche Stäbchen handeln. Wir haben deshalb auch mehrere Stämme aus Kuhkot und Milchproben für die vergleichenden Versuche verwandt. Insgesamt

untersuchten wir 9 aus dem Rachen, 2 aus Mist und 2 aus Milch gezüchtete Stämme; ferner 3 typische Di-B., 3 typische Pseudodi-B. und 3 von Elkeles freundlicherweise zur Verfügung gestellte Fadendi-B. und 4 Eutercorynebakterienstämme.

Zur Differenzierung unserer Stämme prüften wir eine Reihe von Merkmalen, die für Di- und Pseudodi-B. charakteristisch sind. Doch muß hier bereits gesagt werden, daß keine Eigenschaft für sich allein, weder eine morphologische noch biologische, eine bestimmte Diagnose gestattet. Morphologisch ist der typische Di-B. schlank, lang, keulenförmig, der Pseudodi-B. kurz plump, spindelförmig, wenn er auf Löfflerserum wächst. Die für unsere Versuche bestimmten Stämme wurden zunächst auf Löffler-Serum und Hill's Blutagarnährboden gezüchtet und mikroskopisch untersucht. In den Präparaten, die nach Neisser gefärbt wurden, fanden wir folgendes morphologisches Verhalten der Keime:

Stamm 1: Hill: Typische Pseudodi-B., vereinzelte mit Polfärbung.
Löffler: Typische Pseudodi-B. ohne Polfärbung.

Stamm 2: Hill: Typische Pseudodi-B., teilweise mit Polkörperchenbildung.
Löffler: Wie Kokken aussehende Kurzstäbchen.

Stamm 3: Hill: Mittellange und längere, meist polgefärbte Stäbchen, auch vereinzelte kürzere Formen, wirre Lagerung.
Löffler: Typische Di-B.

Stamm 4: Hill: Wie Pseudodi-B. aussehende Stäbchen, ganz vereinzelte mit Polfärbung.
Löffler: Pseudodi-B., ovoidgeformt, keine Polfärbung.

Stamm 5: Hill: Mittellange Fäden mit schwacher Polfärbung.
Löffler: Lange Fäden, doppelt solang wie Di-B., mit Polfärbung.

Stamm 6: Hill: Mittellange und sehr lange hintereinandergelagerte Stäbchen mit deutlicher Polfärbung, dazwischen wie typische Di-B. aussehende Stäbchen.

Stamm 7: Hill: Lange, deutlich polgefärbte Stäbchen.
Löffler: Lange zum Teil hintereinandergelagerte Stäbchen mit schwacher Körnchenbildung.

Stamm 8: Hill: Mittellange und kurze teilweise fadenbildende Stäbchen. Stark ausgebildete Körnchenbildung.
Löffler: Lange hintereinander gelagerte Stäbchen, deutliche Polfärbung.

Stamm 9: Hill: Lange und mittellange Stäbchen, schwache Körnchenbildung, sehr viele Keime ohne Körnchen.
Löffler: Lange Fäden, schlechte Körnchenbildung.

Stamm 10: Hill: Kurze, vorwiegend einzel gelagerte Stäbchen, deutliche Polfärbung.
Löffler: Lange, meist hintereinandergelagerte Stäbchen mit deutlicher Polfärbung.

Stamm 11: Hill: Vorwiegend einzelliegende, ziemlich plumpe, nur vereinzelte polgefärbte Stäbchen.
Löffler: Lange und hintereinandergelagerte Stäbchen und schwache Körnelung.

Stamm: 12: Hill: Kurze und mittellange Formen, deutliche Polfärbung.
Löffler: Lange und sehr lange Stäbchen, zum Teil mit polgefärbten Körnern an den Enden.

Stamm 14: Hill: Vorwiegend lange, einzelliegende Stäbchen mit deutlicher Polfärbung.
Löffler: Lange und sehr lange, vielfach polgefärbte Stäbchen.

Stamm 15: Hill: Mittellange, schwach polgefärbte Stäbchen.
Löffler: Lange und sehr lange Stäbchen, vereinzelt mit Polfärbung.

Stamm 19: Hill: Wie 15.
Löffler: Wie 15, aber etwas länger.

Stamm 20: Hill: Wie 15, aber etwas kürzer.
Löffler: Wie 15.

Stamm 22: Hill: Kurze und mittellange polgefärbte Stäbchen, etwas plumper als Di-B. ohne charakteristische Lagerung.
Löffler: Lange und sehr lange polgefärbte Stäbchen.

Stamm 24: Hill: Kürzere und längere vorwiegend polgefärbte, zarte Stäbchen, typische Di-B.
Löffler: Mittellange, zum Teil polgefärbte Stäbchen mit kolbigen Enden, häufig parallele Lagerung.

Stamm 25: Hill: vorwiegend kürzere und mittellange zum Teil vereinzelte, hintereinandergelagerte, polgefärbte Stäbchen.

Stamm 26: Hill: Mittellange und lange, deutlich polgefärbte Stäbchen in wirrer Lagerung. Aussehen wie typische Di.B.

Stamm 27: Hill: Wie 26, doch ist die Polfärbung bei vielen nicht vorhanden.

Stamm 38: Hill: Viele polgefärbte und auch nicht polgefärbte, mittellange und kurze Stäbchen, keine typischen Di-B.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß es sich bei den Stämmen 1, 2, 4 um echte Pseudo-B., bei den Stämmen 3, 24, 38 um typische Di-B. handelte. Die Fadendi-B.-Stämme 25, 26 und 27 zeigen auf Löffler-Serum neben starren, plumpen auch zierliche, leicht gekörnte polgefärbte Stäbchen in wirrer, paralleler und y-förmiger Lagerung; ihre Lage entsprach im allgemeinen der echter Di-B. Einzelne lagen zu zwei und mehr Stäbchen hintereinander; sie waren in morphologischer Hinsicht von echten Di-B. kaum zu unterscheiden.

Unsere aus Rachen, Milch und Mist rein gezüchteten Stämme 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 19, 20 und 22 zeigten vorwiegend lange (doppelt so lang wie typische Di-B.), aber auch kürzere, oft

in Fäden hintereinander gelagerte, meist plumpe Stäbchen, einzelne Stämme bildeten vorwiegend kürzere und zierlichere Formen. Bei den meisten fiel die sehr starke bis weit in den Bazillenleib hineinragende Polkörperchenbildung auf. Die Lagerung der Stäbchen zeigte nichts Charakteristisches. Ihr morphologisches Aussehen unterschied sich deutlich von dem der echten Di-B.; es war ähnlich dem der Fadendi-B. Doch war die Möglichkeit, daß es sich um atypische Formen von Di-B. handelte, nicht ausgeschlossen.

Bindende Schlüsse können wir aber aus diesem Verhalten nicht ziehen. Wir nahmen nun eine eingehende vergleichende Untersuchung mit echten Di-B., Pseudodi-B. und Eutercorynebakterien vor, um festzustellen, ob es sich bei unseren diphtheroiden Stäbchen um solche der Gruppe der Di-B., der Pseudodi-B. oder anderer Bakterien handelt. Zunächst wurde das Verhalten gegenüber Färbemethoden, die nicht selten eine Unterscheidung von Di- und Pseudodi-B. gestatten, untersucht. Die bekannteste ist die einfache Färbung mit alkoholischer Methylenblau- oder Fuchsinlösung. Unsere diphtheroiden Stämme zeigten wie echte Di-B. eine ungleichmäßige Aufnahme des Farbstoffes; manche Stellen des Bazillenleibes waren stärker, andere nur schwach gefärbt. Bei der Färbung mit alter Methylenblaulösung färbten sich die Körnchen rot, der restliche Teil des Bazillenleibes ungleichmäßig blau.

Die Fadendi-B. 3 Berlin und Berlin Gn 17008 zeigten ebenfalls ungleichmäßige Färbung; neben zierlichen, mittellangen und langen gekörnten Formen (nicht länger als typische Di-B.) sah man auch kaulquappenähnliche Gebilde mit hellen Stellen, ferner aufgeblasene und spindelförmige Stäbchen in wirrer, paralleler und y-förmiger Lagerung. Die Eutercorynebakterien hätte man auf den ersten Blick für kleine Streptokokkenketten halten können, wofür sie beispielsweise Klimmer hält. Bei genauerem Zusehen erkannte man doch kurze und längere Stäbchen, deren Körnchen das streptokokkenähnliche Aussehen vortäuschte. Einzelne Stäbchen waren an den Enden kolbig verdickt, andere zeigten Keulenform. Die Lagerung war wirr und y-förmig.

Hinsichtlich der verlängerten Gramfärbung nach Langer, die recht häufig eine Trennung zwischen Di-B. und Pseudodi-B. gestattet, verhielten sich die Pseudodi-Stämme typisch grampositiv, die Di-B., Fadendi-B. und Eutercorynebakterien gramnegativ. Die meisten diphtheroiden Stämme zeigten gramnegative nur die drei Stämme 12, 15 und 22 wie die Fadendi-Stämme grampositive Färbung. Bindende Schlüsse können wir aber aus diesem Verhalten nicht ziehen, da auch echte Di-B. vorkommen, die sich nach Langer sowohl grampositiv als auch gramnegativ verhalten.

Wenn auf Grund des Aussehens und färberischen Verhaltens der verschiedenen Stämme eine gewisse Trennung möglich war, so konnte über ihre verwandtschaftlichen Beziehungen noch nichts Bestimmtes gesagt werden. Erst bei Prüfung der Beweglichkeit der Stämme traten Merkmale auf, die unsere diphtheroiden Stämme

deutlich von den anderen Typen trennten. Während die echten Di-B., Pseudodi-B., Fadendi-B. und Eutercorynebakterien unbeweglich waren, zeigten von den 12 diphtheroiden Stämmen 10 lebhafte Beweglichkeit. Damit war ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal, ein von Corynebakterien stark abweichendes Verhalten gegeben.

Wie wir bereits erwähnten, zeigten unsere diphtheroiden Stäbchen eine auffallend starke Polkörperchenbildung; auch im Bazillenleibe wurden namentlich bei älteren Kulturen eine stark ausgeprägte Körnchenbildung gesehen.

In weiteren Versuchen, die aber nur mit einem Teil der Stämme durchgeführt wurden, sollte die Natur der letzteren näher studiert werden. Zu dem Zwecke verimpften wir die diphtheroiden Stämme 9, 10 und 11 auf Löfflers Nährboden. Im Neisserpräparat der 24-stündigen Kultur sahen wir:

Stamm 9: Lange, hintereinander gelagerte, nur selten einzelliegende Stäbchen mit deutlicher Polfärbung und mit Körperchen im Bazillenleib. Bazillen länger und dicker als echte Di-B., keine charakteristische Lagerung.

Stamm 10: Lange, zierliche, einzel und hintereinander liegende Stäbchen, ohne typische Lagerung, etwa doppelt so lang wie typische Di-B. Die Dicke und Polfärbung und Protoplasmaanhäufung im Bazillenleib entsprach der echter Di-B.

Stamm 11: Wie bei 10, nur Polfärbung und Körnchenbildung schwächer.

Um die Natur der Körnchen im Bazillenleib festzustellen, färbten wir das Präparat nach der Sporenfärbungsmethode von Möller. Die Präparate von der 24-stündigen Kultur zeigten gleichmäßige blaue Färbung. Am nächsten Tag, also nach 24, ferner nach 3 mal 24 Stunden, wurde die Sporenfärbung mit denselben Kulturen wiederholt. Es wurden auch jetzt keine sporenähnliche Gebilde gesehen. Erst nach 7 Tagen fanden sich: Stamm 9 einzelne Sporen, bei Stamm 10 Sporen inner- und außerhalb der Bazillenleiber und bei Stamm 11 keine Sporen. Stamm 9 und 10 hatten demnach nach 7 Tagen Sporen gebildet. Es erhob sich nun die Frage, gehören die Sporen zu den Bazillen, ferner sind diese Gebilde echte Sporen oder nicht?

Wir stellten zunächst folgende Abtötungsversuche an. Alte Schrägagarkulturen dieser Stämme wurden mit steriler NaCl-Lösung abgeschwemmt; das so gewonnene Material in Jenenser Reagensröhrchen gebracht und im Wasserbad eine halbe Stunde lang auf 60° erhitzt. Dann wurden von dieser erhitzten Abschwemmung 5 Tropfen in ein Bouillonröhrchen gebracht und zur Auskeimung in den Brutschrank bei 37° C gestellt. Am nächsten Tage waren beide Bouillonröhrchen mit feinen Fäden durchzogen. Die Bazillen waren demnach bei einer ½-stündigen Hitzeeinwirkung von 60° C nicht zu Grunde gegangen. Die Aus-Strichpräparate von der Bouil-

lon ergaben eine positive Polkörperchen- und eine negative Sporenfärbung. Nach diesem negativen Ausfall des Abtötungsversuches wurde die gleiche Abschwemmung, die schon eine halbe Stunde auf 60° erhitzt war, eine halbe Stunde in ein Wasserbad von 70° gebracht. Auch diese Temperatur und die eine halbe Stunde lange Einwirkung von 80° überstanden die Bazillen.

Bei einer nach 8 Tagen wiederholten Untersuchung des auf 80° erhitzten Stammes 10 fanden sich Sporen im Präparat. Um nun festzustellen, ob es tatsächlich Sporen waren, wurde zu dieser mit 5 Tropfen beimpften Bouillon, die auf 80° erhitzt worden war, unbeimpfte Bouillon zugegossen, 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, um den Sporen Gelegenheit zum Auskeimen zu geben. Von dieser 24-stündiger Bouillonkultur ergab die Sporenfärbung: Einzelne freiliegende Sporen, ob sie lebten oder nicht war unbestimmt. Dieselbe Bouillonkultur wurde nun ½ Stunde auf 70° im Wasserbad erhitzt, um gegebenenfalls vorhandene Verunreinigung abzutöten, und dann zum Auskeimen der Sporen wieder in den Brutschrank gebracht. Nach 24 Stunden wurden 2 Ösen voll von dieser Doppelbouillon in einfache Bouillon überimpft, um zu prüfen, ob die Sporen noch lebten. Nach 24 Stunden zeigte diese Bouillon eine deutliche Trübung, die Ausstrichpräparate, gefärbt nach Neisser: gute deutliche Polkörperchenfärbung, nach Möller keine Sporen.

Zu dieser mit zwei Ösen beimpften und einer halben Stunde auf 70° erhitzten Bouillonkultur des Stammes 10 wurde 2 Tage später Bouillon zugegossen, eine halbe Stunde auf 80° im Wasserbad erhitzt und in den Brutschrank gestellt. Zugleich wurde ein anderes Bouillonröhrchen mit 2 Ösen dieser so erhitzten Kultur beimpft. Nach 24 Stunden war das Bouillonröhrchen getrübt, das mit zwei Ösen beimpfte, zeigte eine schleierartige Spinngewebstrübung, ein Beweis, daß die Bazillen noch lebten.

Als Kontrolle zu dem Abtötungsversuch des Stammes 10 wurden nun auch Pseudodi-B. und Eutercorynebakterien verwandt. Die drei mit Pseudodi-B., Eutercorynebakterien bzw. diphtheroiden Bazillen (Stamm 10) beimpften Bouillonröhrchen kamen zunächst 24 Stunden lang zum Auskeimen in den Brutschrank. Dann wurden die Stämme 10 Minuten lang im Wasserbad auf 90° erhitzt und nachdem sie in Bouillonröhrchen überimpft waren, in den Brutschrank gebracht. Nach 24 Stunden zeigten die Bouillonröhrchen keinerlei Trübung. Die Keime waren also bei 90° und 10 Minuten langer Hitzeeinwirkung abgetötet worden. Auch nach 48-stündiger Bebrütung zeigte sich das gleiche Ergebnis.

In einem weiteren Versuche werden 24-stündige Schrägagarkulturen mit steriler NaCl-Lösung abgeschwemmt und 10 Minuten lang auf 85° im Wasserbad erhitzt, davon 2 Ösen in Bouillon verimpft und in den Brutschrank gestellt. Kontrollpräparate nach Neisser von den frisch angelegten Kulturen ergaben deutliche Polkörperchenfärbung. Nach 24 bis 48 Stunden war die Bouillon der Pseudodi-B.

vollkommen klar, während die Bouillon des Stammes 10 eine deutliche Trübung zeigte. Also wurden die Pseudodi-B. bei 85° abgetötet, während Stamm 10 erst bei 90° zu Grunde gegangen war.

Aus diesem Abtötungsversuch und auch aus der leichten Färbbarkeit müssen wir schließen, daß es sich bei den vermeintlichen Sporen der diphtheroiden Stämme nicht um echte Sporen gehandelt hat; letztere hätten eine halbstündige Erhitzungsdauer von 90° überstanden; wir müssen annehmen, daß es Plasmaanhäufungen waren, die in älteren Kulturen vieler Bakterienarten entstehen.

Zur Differenzierung unserer diphtheroiden Stämme verwendeten wir auch die Färbung nach Dold:

Bakterien in dünner Schicht ausstreichen, an der Luft trocknen, in der Flamme fixieren und kalt färben:

a) 3 Minuten mit Lösung von Karbol-Anilingrün, die vor Gebrauch durch gehärtetes Filter filtriert wird. Abspülen unter fließendem Wasser, abtrocknen mit Fließpapier, dann

b) 2 Minuten mit Lugolscher Lösung, nicht abspülen, abtrocknen mit Fließpapier, hierauf

c) 5 Minuten Entfärbung mit Harnstoffalkohol, wobei ungefähr nach 1 Minute die Entfärbungsflüssigkeit abzugießen und wiederholt neue Lösung aufzutropfen ist. Gründlich unter fließendem Wasser abspülen, abtrocknen mit Fließpapier und

d) 1 Minute nachfärben mit Bismarckbraun, abspülen und trocknen.

Alle gramnegativen Bakterien verhalten sich auch hier negativ (grüne Farbe des Karbol-Anilingrün wird durch Harnstoff-Alkohol entfernt, Bakterien färben sich mit der Gegenfarbe braun).

Die grampositiven Bakterien zeigen teils ein positives, teils ein negatives, teils ein schwankendes Verhalten, d. h. ein Teil der grampositiven grün, ein anderer Teil gelblich braun gefärbt erscheint, während ein kleiner Teil von Bakterien im Laufe der aufeinanderfolgenden Kulturgenerationen ein unregelmäßig periodisch schwankendes Verhalten zeigt.

Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillen zeigen ein teils schwankendes, teils unregelmäßig wechselndes Verhalten.

Die Färbung der Präparate von der Bouillon, welche auf 80° erhitzt und in der die Bazillen noch am Leben waren, ergab bei Stamm 9 und 10 eine negative Doldfärbung, d. h. die Präparate waren vorwiegend braun gefärbt und bei Stamm 10 waren einzelne Sporen grün gefärbt. Eine Kontrolle der auf Löffler Nährboden gewachsenen Kulturen verhielt sich gegenüber der Färbmethode wie folgt:

Stamm 9 zeigte ein variables Verhalten, die Keime waren Dold-positiv und Dold-negativ.

Stamm 10 Dold-negativ, mit deutlicher Polfärbung und sporenähnlichen Gebilden und

Stamm 11 Dold-negativ mit deutlicher Polfärbung.

Die anderen 10 diphtheroiden Stämme verhielten sich wie folgt: 4 Stämme vollständig negativ, 2 vorwiegend positiv, 2 positiv, 2 vorwiegend negativ, bei ihnen zeigten die Polkörperchen ein positives Verhalten.

Wir prüften nun eine 14 Tage alte Schrägagarkultur des Stammes 10 auf ihr Verhalten gegenüber der Doldfärbung, aber mit folgender Abänderung der Färbemethode:

Ein Präparat wurde zunächst 2 Minuten lang mit heißer 5% Chromsäurelösung gebeizt, ein anderes 2 Minuten lang mit Kaliumpermanganatlösung gebeizt und dann gefärbt; ein drittes Präparat wurde nach der Original-Doldmethode gefärbt. Alle drei Präparate waren Dold-negativ; bei dem mit Chromsäure vorbehandelten waren jedoch einige Polkörperchen grün gefärbt. Weiterhin wurden 9 andere der 24-stündigen Kulturen nach Dold gefärbt; 6 Stämme ergaben vollständig negative Ergebnisse, 3 vorwiegend negative, d. h. einzelne Keime waren positiv oder es waren nur die Polkörperchen positiv. Von Stamm 19, der hierbei das beste positive und negative Präparat lieferte, wurde nun bereits nach 2, 4, 7, 12 und 24 Stunden Abstriche gemacht, um festzustellen, ob das Alter der Kulturen einen Einfluß auf die Färbbarkeit ausübt. Es zeigte sich daß die Keime der 2-stündigen Kultur nur Doldnegativ waren, die der 4, 7, 12 und 24-stündigen dagegen vorwiegend positiv. Wir färbten nun eine 2-stündige Kultur des Stammes 20 und eine von Heubazillen nach Dold. Bei Stamm 20 war der Abstrich nach 2 Stunden noch negativ, nach 4 und 24 Stunden aber positiv, während bei den Heubazillen bereits nach 2 Stunden Doldpositive Bazillen nachgewiesen wurden. Beide Bazillenarten wurden nochmals auf frische Kulturen gebracht und nach 1, 2, 3 und 4 Stunden dünne Ausstriche hergestellt. Die Präparate des Stammes 20 waren nach 1 Stunde und nach 2 Stunden vollkommen negativ, nach 3 Stunden waren einzelne Keime positiv, nach 4 Stunden gleichviel positiv und negativ. Von den Heubazillen zeigten bereits einige nach 1 Stunde positive, nach 2 Stunden sehr viele positive, nach 3 und 4 Stunden die meisten eine positive Färbung.

Wenn wir auch mit Hilfe der Doldfärbung ein charakteristisches Verhalten unserer Stämme nicht beobachteten, so konnten wir doch feststellen, daß sich Dold-positive Keime negativ verhalten, wenn es sich um ganz junge Kulturen handelt; erst nach mehreren Stunden (3—4) wurden sie Dold-positiv.

Wie aus den vorhergehenden Versuchen hervorgeht, können wir mit Hilfe der morphologischen Untersuchungsmethoden eine sichere Unterscheidung der einzelnen Typen bzw. Arten der diphtheroiden Bakterien nicht treffen. Wir zogen deshalb zur weiteren Charakterisierung unserer Stämme auch einige biologische Untersuchungsmethoden heran. Wie bekannt ist, genügt auch nicht die Prüfung auf einem Nährboden, sondern es müssen mehrere herangezogen werden. Als brauchbar hat sich der von Engering angegebene Natrium oleinicum Nährboden in Verbindung mit Zuckerlakmus-

lösung erwiesen, ferner kann mit Erfolg das Wachstum und das Säurebildungsvermögen in Traubenzuckerbouillon geprüft werden (Lubinski, Engering, van Riemsdijk, Jordan, Kindsburg, Kliewe, Pesch). Sodann bleibt noch die Möglichkeit, mit Hilfe des Tierversuches (Meerschweinchen) eine Abgrenzung der fraglichen Stämme vorzunehmen.

Aus der Tabelle 1 (s. Anhang) ersehen wir, daß sämtliche Pseudodi-B. und diphtheroiden Stämme auf Natrium oleinicum Agar wuchsen, die drei echten Di-Stämme, die beiden Fadendi-B. 25 und 27 und die Eutercorynebakterien dagegen nicht. Von den Zuckerarten spalteten die drei echten Di-Stämme Lävulose; Maltose und Saccharose ließen sie unverändert; die drei Fadendi-B.-Stämme vergärten sowohl Lävulose als auch Maltose, Saccharose dagegen nicht. Die echten Di-Stämme müssen, da sie Maltose nicht angreifen als Minusvarianten (Kliewe) angesehen werden. Von den Euter-Corynebakterien spalteten die Stämme 101 nach 7 Tagen Dextrose und Saccharose schwach, Maltose wurde nicht angegriffen; Stamm 104 vergärte nur Dextrose nach 5 Tagen. Der Stamm 103 bildete aus keiner der Zuckerarten Säure. Die drei Pseudodi-Stämme ließen sowohl Maltose als auch Lävulose unverändert; sie spalteten, was für Pseudo-B. charakteristisch ist Saccharose. Die 12 diphtheroiden Stämme wuchsen auf Natrium oleinicum Agar; Maltose vergärten nur 2, Lävulose 3, Saccharose 1 Stamm, wobei von einem Stamm nur Lävulose, von einem anderen Maltose und Lävulose, von einem dritten dagegen sowohl Maltose und Lävulose als auch Saccharose fermentiert wurde; alle übrigen Stämme dagegen ließen Maltose, Lävulose und Saccharose unverändert. Nach diesem biologischen Verhalten spricht das Wachstum auf Natrium oleinicum Agar für Pseudodi-B. und das Verhalten gegenüber Zuckernährböden für Di-B. Auch mit Hilfe der Säurebestimmung konnte eine Gruppierung nicht vorgenommen werden. Wir prüften nun die Stämme auf ihre Fähigkeit Hämolyse zu bilden. Fünf Kubikzentimeter leicht alkalischer Nährbouillon wurden 2 Tropfen steriles Hammelblut zugesetzt, dann die Kulturen beimpft. Wenn Schwoner u. a. eine Beziehung zwischen hohen Menschenpathogenität und hämotoxischer Wirkung annehmen, so konnten die Befunde von Hammerschmidt und Kliewe nicht bestätigt werden. Bei unseren Versuchen zeigten die 4 echten Di- und einer von den 3 Fadendi-Stämmen (17058) hämotoxisches Vermögen. Die 3 Pseudodi- und 4 Corynebakterien-Stämme hatten keine, von den 12 diphtheroiden nur 3 hämotoxische Eigenschaften. Wir können also sagen, daß sämtliche Di-B. hämotoxisch sind, daß diese Eigenschaft aber nicht als ausschlaggebende, differentialdiagnostische Eigenschaft betrachtet werden kann, da sich Pseudodi-B. unterschiedlich verhalten und Di-B. diese Fähigkeiten verlieren können (Kliewe).

Bevor wir das biochemische Verhalten der verschiedenen Stämme kritisch besprechen, sei zunächst das Ergebnis der Tier-

versuche angeführt. Wir prüften die Stämme an Meerschweinchen teils nach der Römer'schen Intracutanmethode, teils unter Anwendung der Subcutanmethode. Bei der Intracutanmethode wurde 0,2 ccm von einer 72-stündigen Bouillonreinkultur in die enthaarte Haut eines Meerschweinchens geimpft. Bei positivem Ausfall des Tierversuches war nach 1, spätestens nach 2 Tagen eine deutliche Impfpustel mit hyperämisch geschwollener Zone zu sehen. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden trat Nekrose und Schorfbildung ein. Von 22 angestellten Prüfungen zeigten 5 Stämme Tierpathogenität und zwar die drei echten Di-, ein Stamm von den diphtheroiden und einer der Fadendi-Stämme (Berlin 3). Bei Anwendung der Subcutanmethode wurde ½ ccm einer 24-stündigen Löffler-Serumkultur-Abschwemmung (3 ccm NaCl-Lösung auf ein Röhrchen) subcutan unter die Bauchhaut gespritzt. Der Tod der Tiere trat bei positivem Ausfall jeweils am 3. oder 4. Tage ein. Zu diesen Versuchen wurden nur die echten Di-, Fadendi-Stämme und der diphtheroide Stamm 9 verwandt, der bei der Intracutanmethode positiv war. Das Ergebnis war, daß der Fadendi-Stamm Berlin 3 und die echten Di-Stämme sich auch jetzt tierpathogen verhielten, dagegen war der vorher positive diphtheroide Stamm 9 negativ. Da bei der Intracutanmethode eine verhältnismäßig große Menge injiziert wurde, muß das positive Ergebnis der Intracutaninjektion als unspezifisch angesehen werden. Jedenfalls geht aus den Tierversuchen hervor, daß unsere diphtheroiden Bazillen keine Di-B. sein können, wenigstens keine echten.

Fassen wir nun das Ergebnis sämtlicher Versuchsergebnisse zusammen, so kommen wir zu der Feststellung, daß sich die Pseudodi-B.-Stämme 1, 2 und 4 auf Natrium oleinicum Agar gegenüber Maltose, Lävulose, Saccharose und im Tierversuch wie typische von Hofmann-Wellenhof'sche Pseudodi-B., unsere Di-Stämme 3, 24 und 38 wie typische Di-B. verhielten. Die Fadendi-Stämme zeigten unterschiedliches Verhalten. Der Stamm Berlin 3 wuchs nicht auf Natrium oleinicum Agar, er spaltete keine Saccharose und tötete das Meerschweinchen nach 4 Tagen; der Stamm muß deshalb zu den echten Di-B. gezählt werden. Der Fadendi-Stamm 17088 wuchs nicht auf Natrium oleinicum Agar, griff Saccharose nicht an und war im Tierversuch negativ, er gehört deshalb zur Gruppe der Di-B., jedoch zu den avirulenten. Der Fadendi-Stamm Berlin G verhielt sich weder wie Di-B. noch wie Pseudodi-B. (Wachstum auf Natrium oleinicum Agar, keine Spaltung von Saccharose, negativer Tierversuch). Doch ist er, weil er auf ölsaurem Natrium Agar wuchs, eher zu letzteren als zu Di-B. zu zählen. Unseres Erachtens ist die besondere Bezeichnung Fadendi-B. nicht gerechtfertigt, da die Keime in morphologischer Hinsicht von echten Di-B. nicht zu trennen sind. Wenn auch in manchen Kulturen etwas längere oder hintereinander gelagerte Stäbchen vorkamen, so haben wir wiederholt bei unseren täglichen Di-Untersuchungen ähnliche Stäbchen gefunden, die tierpathogen waren; der uns übersandte

Fadendi-Stamm Berlin 3 war ja bei uns auch tierpathogen, er ist somit ein echter Di-Stamm. Andererseits ist auch bekannt, daß echte Di-B. biochemische Eigenschaften verlieren oder gewinnen können, wir müssen deshalb die Fadendi-B., die sich bei unserer Prüfung nicht einheitlich verhielten, als Minus- bzw. Plusvarianten von Di- bzw. Pseudodi-B. ansehen und die Bezeichnung Fadendi-B. ablehnen. Wenn die Faddendi-Stämme mit spezifischem Immunserum höher agglutinieren, so ist das verständlich. Kliewe hat auch häufig bei der Agglutination von Minusvarianten mit spezifischem Immunserum hohe Agglutinationswerte, mit typischen Di- und Pseudodi-Stämmen dagegen negative Ergebnisse erzielt. Wir lehnen auch eine besondere Bezeichnung für die in Wunden gefundenen Corynebakterien, die Paradi-B., ab. Auch bei ihnen handelt es sich um durch Umweltfaktoren bedingte mehr oder weniger veränderte Di-B. Ähnlich verhält es sich mit den Eutercorynebakterien. Der Stamm 101, der in Abweichung von echten Di-B. Saccharose vergärte, war im Tierversuch positiv (Sektionsbefund typisch). Er zählt deshalb zu den echten Di-B. Die Spaltung von Saccharose muß als eine Plusvariation angesehen werden. Nach Beobachtungen von Kliewe sind diese häufig meerschweinchenpathogen. Auch in ihrem sonstigem biochemischen Verhalten gleichen die Eutercorynebakterien echten Di-B. Ihr unterschiedliches, morphologisches Verhalten deutet auf eine Standortsmodifikation hin.

Unsere diphtheroiden Stämme können nicht als Di-B. angesehen werden, weil sie auf ölsaurem Natrium wuchsen und beweglich waren; sie sind auch nicht zur Gruppe der Pseudodi-B. zu zählen, weil sie Saccharose nicht angriffen und beweglich waren. Ihr morphologisches und biochemisches Verhalten spricht dafür, daß es sich um den Bazillus bipolaris handelt, der auch von Walter öfters bei Rachenuntersuchungen von Schulkindern gefunden wurde. Walter charakterisiert die Stäbchen wie folgt: In den mit Polkörperfärbung behandelten Präparaten sah man schlanke, besonders gut gefärbte Stäbchen, die an ihren beiden Enden je ein typisch gelagertes tiefschwarzes Korn trugen. Die Lage und Dicke der Stäbchen glichen im allgemeinen der der Di-B., nur wurden bisweilen einige Exemplare, die um ein geringes größer schienen, bemerkt. In den mit alkoholischer Methylenblaulösung behandelten Präparaten wich das Aussehen von dem gewohnten Bild der Di-B. ab. Die Keime erschienen als kompakt gefärbte Stäbchen mit leicht abgerundeten Enden, auch einige gekrümmte und keulenförmige kamen vor. Die Lagerung ist nicht charakteristisch, ihre Beweglichkeit langsam, sie zeigen aber deutliche Eigenbewegung. Auf Serum wuchsen die Keime üppig, auf gewöhnlichem Agar und Glycerinagar ziemlich schlecht, in Traubenzuckeragarausstrichkulturen nur an der Oberfläche. In Bouillon riefen sie eine gleichmäßige Trübung und krümmeligen Bodensatz hervor, Gelatine wurde nicht verflüssigt. In Kulturen, die älter als 24 Stunden waren, zeigte sich deutliche „Sporen"-bildung. Virulenzprüfung war bei Meerschweinchen, Mäusen und

Kaninchen negativ. Unsere diphtheroiden Stäbchen entsprechen in wesentlichen Merkmalen diesen Eigenschaften, doch können wir sie nach unseren Versuchen nicht als Sporenbildner bezeichnen. Die Körperchen, die sich im Bazillenleib bilden, sind keine Sporen, da sie Farbstoffe leicht aufnehmen und bereits durch ½-stündiges Erhitzen bei 90° C zu Grunde gehen. Es handelt sich vielmehr um kleine Kugeln, die wie Vakuolen aussehen und als Reservestoffe enthaltende metachromatische Körperchen anzusprechen sind. In jungen Bazillen sieht man an ihrer Stelle netzartige Protoplasmastrukturen. Wir dürfen annehmen, daß die Stäbchen mit dem Kuhkot in die Milch und dann in den Rachen der Kinder gelangt sind. Wahrscheinlich sind sie aber auch anderswo in der Außenwelt zu finden. Da sie auch bei gesunden Kindern gefunden werden, sind sie als harmlos anzusehen.

Zusammenfassung.

1. Neun aus dem Rachen gezüchtete Stämme, die morphologisch wie Corynebakterien aussahen, wurden mit typischen Pseudodi-B., ferner mit Fadendi-B. und Eutercorynebakterien vergleichend untersucht.

2. Das morphologische und biochemische Verhalten (Beweglichkeit, Nichtspaltung von Saccharose und Wachstum auf ölsaurem Natrium-Agar) trennte sie von Pseudodi- und echten Di-B. Sie zeigten ähnliche Eigenschaften wie der bazillus bipolaris.

3. Die bei alten Kulturen gefundenen sporenähnlichen Gebilde sind metachromatische Körperchen.

4. Die von Meissner als Fadendi-B. bezeichneten Bazillen verhielten sich biochemisch nicht einheitlich. Sie sind wie die Eutercorynebakterien (Evans-Steck) als echte tierpathogene Di-B. bzw. als Plus- oder Minusvarianten von diesen anzusehen.

5. Bei Anwendung der Doldfärbung zeigten die Pseudodi-Di-B. und die diphtheroiden Stämme (B. bipolaris) ein unterschiedliches Verhalten.

6. Ganz junge (2—3stündige) Kulturen grampositive Bazillen zeigten Dold-negative Färbung, erst nach 3 Stunden wurden sie Dold-positiv.

Herrn Obermed.-Rat Prof. Dr. H. Kliewe danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für die außerordentlich mühevolle Mitarbeit und weitgehende Unterstützung.

LITERATUR

Almquist: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 101, 1924.
Bernhard u. Paneth: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 57, 1913.
Engering: Ebenda Bd. 89, 1923.
Escherisch: Ebenda Bd. 7, 1890.
Gins: Dtsch. med. Wochenschr. 1913.
Gotschlich: Dtsch. med. Wochenschr. 1919 und Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93, 1924.
Hammerschmidt: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93, 1924.
Hofmann: Ebenda Bd. 2, 1887 und Wien. med. Wochenschr. 1888.
Killian: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 102, 1924. Zentralbl. f. Bakt. I. Orig. Bd. 101, 1926.
Kliewe u. Westhues: Münch. med. Wochenschr. 1925.
Kolle und Schlossberger: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 90, 1920.
Langer: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 78, 1916.
Lubinski: Ebenda Bd. 85, 1921.
Martin: Zit. nach Kolle-Wassermann Bd. 5, 3. Aufl.
Neisser: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 24, 1897.
Pesch: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92, 1924.
Pesch u. Gottschalk: Ebenda Bd. 93, 1925.
Prell: Ebenda Bd. 79, 1917.
Radice: Ebenda Bd. 91, 1924.
Van Riemsdijk: Ebenda Bd. 75, 1915.
Römer: Berlin. klin. Wochenschr. 1914.
Roux u. Jersin: Ann. de l', Inst. Pasteur 1890.
Schwoner: Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35, 1904.
Trautmann u. Dale: Ebenda Bd. 74, 1910.

Tabelle

Nr.	Bezeichnung der Stämme	Wachstum auf Natr. olein.-Agar	Verhalten zu den Lackmuszuckernährböd.: Maltose	Laevulose	Saccharose	Haemolyse	Beweglichkeit	Langerfärbung	Wachstum in Bouillon	Ph 8,28	Virulenz für Meerschweinchen: intrakutan tumor	subcuta
1	Pseudodi 997	+	—	—	+	—	—	+	leicht getr., ger. Bodensatz	8,32	—	
2	Pseudodi 202	+	—	—	+	—	—	+	klar, ger. Körnelung	8,32	—	
4	Pseudodi 150	+ +	—	—	+	—	—	+	leichte Trübg., Bodensatz	8,47	—	
3	Di-Stamm 1	—	—	+	—	+	—	—	klar, ger. Körnelung	8,37	Ø	+ 4 Tag
24	„ 43	—	+	+	—	+	—	—	l. Trübg., Flocken, Bodensatz	7,93	Ø	+ 3 Tag
38	„ B	—	—	+	—	+	—	—	klar, Körnelg., etwas Bodens.	7,91	Ø	+ 3 Tag
5	Fadendi 17	+	—	—	—	—	+	—	klar, deutl. Bodstz. Schlieren	8,47	—	
6	„	+	—	+	—	+	+	+	„ „ Körnelg.	7,91	+	
7	„ 23	+	—	—	—	—	+	—	deutl. Trübg. u. Bodensatz	8,47	—	
8	„ Gießen 3	+ +	—	—	—	—	+	—	„ „ „ „	8,37	—	
9	Labor	— +	—	+	—	—	+	—	„ „ „ „	8,37	+	—
10	Förster	+	—	—	—	—	+	—	„ „ „ „	8,45	—	
11	Winkler	+	—	—	—	—	+	—	„ „ „ „	8,45	—	
12	Raimann	+	—	—	—	—	+	+	„ „ „ „	8,45	—	
14	Fadendi Rachen	+ +	—	—	—	—	+	+	„ „ „ „	8,47	—	
15	Milch 12	+	—	—	—	—	+	+	„ „ „ „	8,47	—	
19	Mist I. a	+ +	+	+	—	+	—	—	starke „ „ „	8,47	—	
20	„ I	+ +	+	+	—	+	—	—	„ „ „ „	8,45	—	
22	Milch	+	—	—	—	+	+	+	„ „ „ flock. Bdstz.	8,37	—	
25	Fadendi Berlin G	+ +	+	+	—	—	—	—	deutl. Trübg., ger. Flck., Bdstz.	8,37	—	—
26	„ 17058	—	+	+	—	+	—	—	„ „ „ „ „	8,47	—	—
27	„ Berlin 3	—	+	+	—	—	—	—	„ „ „ „ „	7,93	+	+ 4 Tag
101	Eutercorynebakt.	—	—	—	+ 7 Tag.	—	—		leichte Trübung, Körnelung			+ 30 h
102	„	—	—	—	—	—	—		„ „ „			—
103	„	—	—	—	—	—	—		„ „ „			—
104	„	—	—	—	—	—	—		„ „ „			—

LEBENSLAUF.

Am 13. Mai 1909 wurde ich, Ferdinand Alois Stenger als Sohn des Zeichners und Weißbindermeisters Ferdinand Adolf Stenger und seiner Ehefrau Anna Regina, geb. Schwab, zu Seligenstadt, Hessen geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule wurde ich in das Progymnasium zu Seligenstadt aufgenommen, das ich bis zur Untertertia besuchte. Ostern 1924 trat ich in das Gymnasium zu Bensheim a.d. B. ein und bestand dort am 31. 1. 1929 die Reifeprüfung.

Hierauf widmete ich mich dem Studium der Medizin und besuchte die ersten 6 Semester die Universität in Gießen. Nach bestandenem Physikum im Wintersemester 1931/32 studierte ich im Sommersemester 1932 in Wien, im W.-S. 1932/33 in Frankfurt/M.; die letzten 3 Semester — S.-S. 1933, W.-S. 1933/34, S.-S. 1934 — verbrachte ich wieder an der Universität Gießen, wo ich im Wintersemester 1934/35 mein medizinisches Staatsexamen bestand. Den ersten Teil des praktischen Jahres absolvierte ich an der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses Frankfurt/M. Seit 1. September 1935 bin ich am St. Vincenzkrankenhaus Hanau/M. beschäftigt.